مقاله
پژوهشی

اثر عصاره آبی انار ترش بر روی بقای پروتواسکولکس اکینوکوکوس گرانولوزوس در آزمایشگاه

زهرا جعفری[1]، سهیلا روحانی[2]*، مریم نیتی[3]، محمد کمالی نژاد[4]، فرید زائری[5]

[1]کارشناس ارشد انگل شناسی پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ، تهران، ایران.
[2]استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
[3]دانشیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
[4]مربی گروه مطالعات دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
[5]دانشیار مرکز تحقیقات پروتئومیکس و گروه آمار زیستی، دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
***نویسنده مسئول:** تهران، بزرگراه چمران، ولنجک، خیابان یمن، میدان دانشجو، بلوار دانشجو؛ خیابان کودکیار
پست الکترونیک: srouhani11@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: *کیست هیداتیک بیشتر درکبد و ریه دیده می شود. استفاده از پروتواسکولکس کشها در حین جراحی برای کاهش عود بیماری ضروری است. تا به حال ماده پروتواسکولکس کشی که کاملا" مؤثر و عوارض جانبی کمی داشته باشد، شناخته نشده است. اثرات ضد باکتری، قارچی و انگلی انار Punica granatum به اثبات رسیده است. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات پروتواسکولکس کشی عصاره آبی انار ترش برای اولین بار در ایران است.*

مواد و روش کار: *درصد حیات پروتواسکولکس های کیست هیداتیک توسط رنگ آمیزی ائوزین ۰/۱٪ سنجیده شد. فعالیت پروتواسکولکس کشی عصاره آبی انار ترش ۸۰ mg/ml، ۷۰، ۶۰ در زمان های ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه بررسی گردید. سرم فیزیولوژی و نمک اشباع به عنوان کنترل منفی و مثبت مورد استفاده قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون تحلیل واریانس دوطرفه و آزمون Tukey استفاده شد.*

یافته ها: *بیشترین فعالیت پروتواسکولکس کشی مربوط به غلظت ۸۰mg/m بوده که بعد از ۱۵ دقیقه مواجهه، باعث از بین رفتن ۱۰۰٪ پروتواسکولکس ها شده است. با اینکه عصاره ۷۰mg/ml فعالیت پروتواسکولکس کشی اش در ۱۰ دقیقه اول کمتر بوده، اما بعد از ۱۵ دقیقه باعث از بین رفتن تمام پروتواسکولکس ها شده است. آزمون تحلیل واریانس دوطرفه نشان داده است که بین غلظتهای مختلف عصاره آبی انار ترش و اثر پروتواسکولکس کشی آن، اختلاف آماری معنی داری وجود دارد (p<۰/۰۵).*

نتیجه گیری: *نتایج نشان داد که عصاره آبی انار اثر پروتواسکولکس کشی دارد لذا می تواند پس از بررسی در مدل حیوانی و آزمایشهای تکمیلی، به عنوان پروتواسکولکس کش مؤثر مورد استفاده قرار گیرد.*

واژه های کلیدی: *کیست هیداتیک، انار، پروتواسکولکس کش، عصاره آبی*

مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی سال ۹، دوره ۹ (۱): ۷۴-۶۵
Journal of North Khorasan University of Medical sciences 2017;9(1): 65-74

وصول: ۹۵/۰۸/۰۱
اصلاح: ۹۵/۰۹/۰۶
پذیرش: ۹۵/۰۹/۰۷

DOI: *http://journal.nkums.ac.ir/article-1-1123-fa.html*
Cite this article as: *Jafari Z, Rouhani S, Niyyati M, Kamalinejad M, Zayeri F. Invitro effectiveness of Punica granatum Aqueous Extract on Viability of Echinococcus granulosus Protoscolex . JNKUMS. 2017; 9 (1) :65-74*

مقدمه

هیداتیدوزیس یکی از مهمترین بیماری های کرمی است که توسط اکینوکوکوس گرانولوزوس (Echinococcus granulosus) ایجاد می شود. میزبان واسط آن طیف وسیعی از علفخواران می باشد و انسان به طور تصادفی به کیست هیداتیک مبتلا می گردد [۱]. در مناطق روستایی شرق و جنوب اروپا، سواحل مدیترانه، خاورمیانه، امریکای لاتین و آفریقا بالاترین درصد آلودگی از انسان گزارش شده است. این بیماری تقریبا در تمامی نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا خصوصا نواحی که ارتباط نزدیک بین انسان و سگ وجود دارد به وفور دیده می شود [۱،۲]. جراحی و روش PAIR (Puncture,Aspiration,Injection and Reaspiration) به عنوان یکی از اولین و بهترین گزینه ها در درمان این بیماری مطرح است و در هنگام جراحی، پروتواسکولکس کش های مختلف شیمیایی جهت جلوگیری از ایجاد کیست های ثانویه مورد استفاده قرار می گیرد که اغلب اثرات سوئی بر روی نسج سالم عضو مبتلا دارد [۱، ۳، ۴].

انتشار مایع هیداتید حاوی پروتواسکولکس در هنگام جراحی مهمترین علت عود بیماری است. تا به امروز محلول های مختلف پروتواسکولکس کش در جراحی و روش های زیر جلدی مورد استفاده قرار گرفته اند [۵، ۶]. هر چند ماده ایده آلی که به طور کامل موثر و همچنین بدون عارضه جانبی باشد تا کنون شناخته نشده است [۶]. محلول نمک هایپر تونیک، نیترات نقره، ستریمیدین و فرمالین از متداولترین پروتواسکولکس کش ها می باشند که هرکدام عوارض خطرناکی مانند فیبروز مجاری صفراوی و نکروز کبدی را باعث می شوند [۵]. کلانژیت اسکلروزان ناشی از این مواد عارضه خطرناکی است که ممکن است بعد از جراحی و عبور محلول های پروتواسکولکس کش از مجاری صفراوی ایجاد گردد[۶]. از این رو سازمان بهداشت جهانی (WHO) نیاز فوری به یافتن یک پروتواسکولکس کش جدید با تأثیر بیشتر و عوارض کمتر را اعلام نموده است [۵]. با توجه به اینکه گیاهان داروئی به دلیل ماهیت طبیعی و وجود ترکیبات هومولوگ داروئی در کنار هم با بدن سازگاری بهتری دارند و فاقد عوارض ناخواسته هستند، می توانند به عنوان یک راهکار جدید مورد استفاده قرار گیرند [۷]. بررسی چند دهه اخیر دراین زمینه نشان می دهد که محققین از عصاره های مختلف آبی، آبی _ الکلی، الکلی، کلروفرمی و گاهی اسانس گیاهان بدین منظور استفاده نموده اند. در بررسی مؤذنی و همکاران درسال ۲۰۱۰، نتایج نشان دادکه عصاره متانولی سیر(Allium sativum) درغلظت ۵۰ mg/ml بعد از ۱۰ دقیقه باعث از بین رفتن ۱۰۰٪ پروتواسکولکس ها می شود [۸]. روحانی و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثرات پروتواسکولیسیدال عصاره آبی زرشک (Berberis vulgaris) را در غلظت ۴ mg/ml را بعد از ۵ دقیقه ۱۰۰٪ گزارش نموده اند [۹]. در حالی که صالحی و همکاران اثر پروتواسکولکس کشی عصاره آبی-الکلی همین گیاه را در غلظت ۲ mg/ml در ۵ دقیقه اول مواجهه ۱۰۰٪ اعلام نموده اند [۱۰]. فاتین ابدال در سال ۲۰۰۹ در عراق گزارش نمود که عصاره آبی ۲۰٪ اویار سلام (Cyperus longous) بعد از ۲۴ ساعت، باعث مرگ و میر ۱۰۰٪ پروتواسکولکس ها می شود [۱۱].

انار با نام علمی Punica granatum گیاهی است که از گذشته از بخش های مختلف آن برای درمان بیماریهای مختلف استفاده می کردند. اکثر محققین نوشته اند انار بومی ایران بوده و بتدریج در مناطق آسیای مرکزی تا هیمالیا، خاورمیانه، آسیای صغیر و حوزه مدیترانه گسترش یافته است. پراکندگی وسیع انارهای وحشی در سواحل دریای خزر و همچنین جنگل های جلگه ای و نقاط استپی مانند جنگل های غرب در لرستان، کردستان، چهارمحال بختیاری، فارس، بلوچستان و در دامنه های جنوبی البرز، در دره های شرق و غرب منجیل و دره لوشان تأییدی بر این مطلب می باشد. آنچه مسلم است کشت انار و بهره برداری از آن از زمان باستان متداول بوده است [۱۲]. میوه انار شامل مواد معدنی،آمینواسیدها، ترکیبات اسیدی شامل:اسید سیتریک، اسید تارتاریک، اسید مالیک و اسیدآسکوربیک (ویتامینC) می باشد و همچنین دارای ترکیبات ضد سرطانی و آنتی اکسیدانها شامل آنتروسیانین، تانین هاو پونیکا لاژین است [۷،۱۳]. بررسی های مختلف اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد انگلی این گیاه را در Invivo و Invitro نشان داده

است به عنوان مثال اثر ضد باکتریایی انار بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و اثر ضد قارچی بر روی آسپرژیلوس نایجر و اثر ضد انگلی بر روی کرم بالغ شیستوزوما مانسونی و تریکوموناس تناکس ثابت شده است [۱۲، ۱۳]. با توجه به بازنگری های انجام شده، برای اولین بار تأثیر عصاره آبی انار ترش در رقت ها و زمان های مختلف برروی پروتواسکولکس های اکینوکوکوس گرانولوزوس در آزمایشگاه بررسی شد.

روش کار

کبد و ریه آلوده به کیست هیداتیک در کشتارگاه توسط دامپزشک تشخیص و به دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی منتقل شدند. پس از بررسی عضو مربوطه و انتخاب کیست های مناسب (حداکثر ۳ کیست در هر عضو)، کیستهای کلسیفیه و چرکی از مطالعه خارج شدند. سپس سطح کیست های مناسب را با الکل ۷۰ ٪ پاک نموده و توسط سرنگ مایع هیداتیک داخل کیست را آسپیره کرده و مایع هیداتید حاوی پروتواسکولکس را با دور ۱۵۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس رسوب حاوی پروتواسکولکس ها را ۳ مرتبه با سرم فیزیولوژی شستشو داده و به رسوب مرحله آخر، بر حسب میزان رسوب پروتواسکولکس چند سی سی سرم فیزیولوژی اضافه کرده تا سوسپانسیون یکنواختی تهیه شود. سعی بر آن شد که تعداد پروتواسکولکس ها در هر میلی لیترحدوداً ۵۰۰۰ عدد باشد. سپس درصد حیات اولیه پروتواسکولکس ها توسط رنگ آمیزی حیاتی ائوزین ۰/۱٪ و به کمک میکروسکوپ نوری و به کمک دستگاه LC-10 Cell Counter (Labtron Electromax NY, Hauppauge, تعیین گردید. پروتواسکولکس های زنده بی رنگ و شفاف باقی می مانند و پروتواسکولکس های مرده و نیمه مرده بعلت نفوذ رنگ ائوزین قرمز دیده می شود. هدف از این کار انتخاب کیست هایی با زیست پذیری (Viability) بالای پروتواسکولکس ها می باشد. تمام کیست های مورد استفاده در این تحقیق دارای Viabilityبالای ۹۰ ٪ بوده اند. جهت تهیه عصاره آبی انار ترش، انارها از شهر بهشهر تهیه و دانه های انار از پوست آن جدا شد و سپس توسط دستمال تنظیف آبگیری شد و آب انار استحصال شده با بن ماری تغلیظ گردید تا عصاره خشک حاصل شود.عصاره حاصل به دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی گروه انگل شناسی منتقل شد و در یخچال نگه داری گردید. ضمناً از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با فاز معکوس مجهز به ستون یون برای جداسازی و تعیین مقدار اسید سیتریک عصاره انار استفاده شد. یکی از معیارهای قابل اندازه گیری برای تعیین ترش بودن انار، میزان اسید سیتریک انار می باشد. میزان اسید سیتریک انار ترش و شیرین منطقه مورد مطالعه به روش فوق بترتیب ۰/۸ mg/ml و ۰/۰۲ mg/ml گزارش شد.

در این مطالعه برای تعیین حجم نمونه و رقت مناسب به دلیل نبودن الگوی مشابه، مطالعه اولیه (Pilot Study) انجام گرفت و در نهایت از رقت های ۸۰، ۷۰، ۶۰ میلی گرم عصاره آبی انار ترش در میلی لیتر سرم فیزیولوژی استفاده شد با استفاده از نرم افزارG-Power، تعداد نمونه مورد بررسی ۲۰ کیست تعیین گردید. برای انجام این پژوهش، به یک واحد سوسپانسیون پروتواسکولکس های کاملاً یکنواخت شده (۲۰۰ میکرولیتر)، چهار واحد محلول آبی انارترش (۸۰۰ میکرولیتر) با رقت های بدست آمده در مطالعات اولیه، در لوله های جداگانه اضافه نمودیم. به هریک از لوله ها نیز ۲۰۰ لاندا ائوزین ۰/۱٪ اضافه شد و درزمانهای ۵،۱۰ و ۱۵ دقیقه تأثیر عصاره آبی انار روی پروتواسکولکس ها در زیر میکروسکوپ بررسی گردید.

هر بار ۱۰۰ عدد پروتواسکولکس شمارش گردید. برای دقت بیشتر عمل شمارش برای هر مرحله از مطالعه ۴ مرتبه انجام گرفت. سرم فیزیولوژی و نمک اشباع به ترتیب به عنوان کنترل منفی و مثبت مورد استفاده قرار گرفت. جهت ثابت نگه داشتن درصد مواد مؤثر بر روی سوسپانسیون پروتواسکولکس ها، هر واحد محلول معادل ۲۰۰ میکرولیتر (لاندا) در نظر گرفته شد. با توجه به این که تأثیر پنج نوع ماده شامل سه رقت عصاره انار به همراه کنترل مثبت و منفی در سه زمان مختلف بر روی پروتواسکولکس ها بررسی شد، در واقع برای انار ترش ۳۰۰ = ۲۰x۵x۳ مرتبه آزمایش انجام گرفت. (البته این تعداد صرف نظر از ۴ مرتبه شمارش هر آزمایش، محاسبه شده است). از آنجا که هدف اصلی مقایسه میزان زنده ماندن پروتواسکولکس ها در گروه های آزمایشی در طول

زمان های مختلف است، برای تحلیل داده ها از روش های مبتنی بر تحلیل واریانس نظیر آنالیز واریانس چند طرفه و یا تحلیل واریانس اندازه های تکراری استفاده شد. از این رو توصیف داده ها به کمک آمارهای توصیفی نظیر میانگین و انحراف معیار، توسط SPSS 16 انجام شد. برای ارزیابی نوع درمان بر تغییرات حیات، از آزمون تحلیل واریانس دوطرفه (Two way ANOVA) و آزمون مقایسه چندگانه Tukey استفاده شد.

یافته ها

میانگین و انحراف معیار فعالیت پروتواسکولکس کشی عصاره آبی انار ترش و کنترل مثبت و منفی بر حسب زمان و رقت های مختلف در جدول ۱ آمده است:

بیشترین فعالیت پروتواسکولکس کشی مربوط به عصاره ۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر بوده که بعد از ۱۵ دقیقه مواجهه، باعث از بین رفتن ۱۰۰٪ پروتواسکولکس ها شده است، به عبارتی مانند کنترل مثبت عمل کرده است. البته در مجموع با اینکه عصاره ۷۰ میلی گرم بر میلی لیتر فعالیت پروتواسکولکس کشی اش کمتر از ۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر است اما بعد از ۱۵ دقیقه مواجهه، این رقت نیز تمام پروتواسکولکس ها را از بین برده است. با توجه به جدول ۱ در هر سه رقت با افزایش زمان مواجهه، میزان مرگ و میر پروتواسکولکس ها افزایش یافته اند. برای مقایسه فعالیت پروتواسکولکس کشی غلظت های مختلف عصاره آبی انارترش و کنترل مثبت و منفی از آزمون تحلیل واریانس دوطرفه (Two Way ANOVA) استفاده شد. نتایج این آزمون درجدول ۲ نشان می دهد که بین غلظت های مختلف عصاره آبی انار ترش و اثر پروتواسکولکس کشی آن ها، اختلاف آماری معنی داری وجود دارد ($p < ۰/۰۵$).

با توجه به این جدول، چهارزیرگروه یعنی زیر گروه ۱ (کنترل منفی)، زیر گروه ۲ (۶۰ mg/ml)، زیرگروه ۳ (۷۰mg/ml) و زیرگروه ۴ (کنترل مثبت و ۸۰ mg/ml) مشاهده می شود که فعالیت پروتواسکولکس کشی بین این زیرگروه ها معنی دار می باشد. فقط غلظت (۸۰mg/ml) همانند کنترل مثبت عمل کرده و در یک گروه قرار گرفته اند.

نمودار ۱ روند تغییرات میانگین پروتواسکولکس کشی عصاره آبی انار ترش برای انواع مجاورسازی در زمان های ۱۰، ۵ و ۱۵ دقیقه را نشان می دهد. با توجه به نمودار، کنترل منفی با فاصله زیادی از عصاره ها و کنترل مثبت قرار گرفته است. عصاره ۸۰ mg/ml بسیار نزدیک به کنترل مثبت است.

جدول۱: میانگین و انحراف معیار فعالیت پروتواسکولکس کشی عصاره آبی انار ترش برحسب زمان و رقت های مختلف

رقت عصاره mg/ml	۵دقیقه	۱۰دقیقه	۱۵دقیقه	مجموع
	میانگین ±انحراف معیار	میانگین ±انحراف معیار	میانگین ±انحراف معیار	میانگین ±انحراف معیار
۶۰	۷۰/۷±۱۲/۴	۸۵/۲ ± ۶/۷	۹۷/۰ ± ۲/۹	۸۴/۳ ± ۱۳/۶
۷۰	۸۹/۰±۶/۹	۹۴/۰ ± ۶/۸	۱۰۰ ± ۰۰/۰	۹۴/۵ ± ۷/۱
۸۰	۹۶/۰±۳/۸	۹۹/۰ ± ۲/۶	۱۰۰ ± ۰۰/۰	۹۸/۳±۳/۱
کنترل مثبت*	۱۰۰ ± ۰۰/۰	۱۰۰ ± ۰۰/۰	۱۰۰ ± ۰۰/۰	۱۰۰ ± ۰۰/۰
کنترل منفی**	۶/۸±۲/۳	۸/۰ ± ۳/۴	۱۱/۲ ± ۳/۰	۸/۶ ± ۳/۴

*کنترل مثبت = نمک اشباع

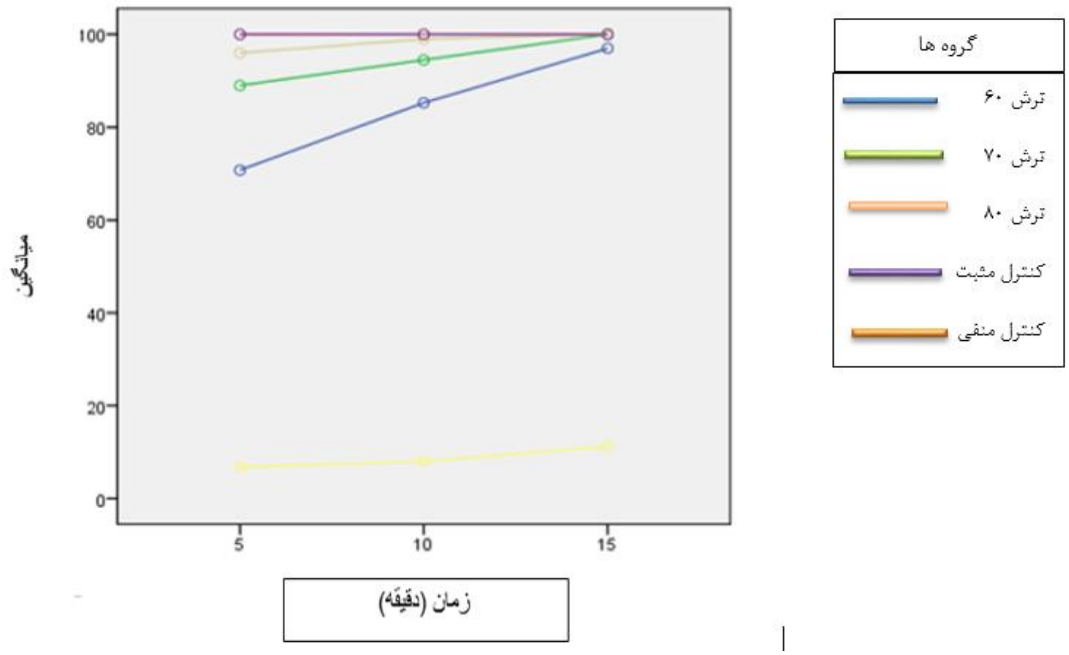
**کنترل منفی = سرم فیزیولوژی

جدول۲ : نتایج آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه فعالیت پروتواسکولکس کشی غلظت های مختلف عصاره آبی انار ترش و کنترل مثبت و منفی

گروه ها	تعداد	زیرگروه ها			
		۱	۲	۳	۴
کنترل منفی**	۶۰	۸/۶۷			
غلظت mg/ml۶۰	۶۰		۸۴/۳۳		
غلظت mg/ml۷۰	۶۰			۹۴/۵۰	
غلظت mg/ml۸۰	۶۰				۹۸/۳
کنترل مثبت*	۶۰				۱۰۰/۰۰
P- value		۱.۰۰۰	۱.۰۰۰	۱.۰۰۰	۰/۳۳۳

**کنترل منفی = سرم فیزیولوژی

*کنترل مثبت = نمک اشباع



نمودار۱: روند تغییرات میانگین فعالیت پروتواسکولکس کشی عصاره آبی انار ترش برای انواع مجاور سازی در طول زمان

بحث

محلول های مختلف پروتواسکولکس کش در جراحی وروش زیر جلدی مورد استفاده قرار گرفته اند [۱۴، ۱۵]. هر چند ماده ایده آلی که به طور کامل موثر و همچنین بدون عارضه جانبی باشد تاکنون شناخته نشده است [۱۵]. فرمالین از قدیمی ترین مواد است که در گذشته مکرراً مورد استفاده قرار می گرفت و با وجود تأثیر زیاد آن برروی پروتواسکولکس، ولی به دلیل اثرات سمی وعوارض شدید در مجاری صفراوی، مدت ها است که استفاده از آن منسوخ شده است [۵].

عوارض کبدی الکل اتیلیک ۹۵٪، بعد از ۱۵ دقیقه ظاهر می گردد. محلول نمک ۱۰٪ در ۵ دقیقه اول مواجهه اثر اسکولکس کشی ندارد ولی در غلظت ۲۰٪ اثر پروتواسکولکس کشی دارد که در این غلظت عوارض کبدی نیز گزارش شده است. پراکسیدهیدروژن بعد از ۱۵ دقیقه مواجهه، اثر اسکولکس کشی ۱۰۰٪ دارد، ولی بخاطر عوارض جانبی، امروزه مورد استفاده قرار نمی گیرد [۱۶]. ستریمیدین درغلظت پایین تا ۰/۱٪ اثر اسکولکس کشی دارد، ولی بدلیل ایجاد عوارض متعدد منجمله اسیدوزمتابولیک و گلوبینمیا، امروزه بدین منظور از آن استفاده نمی شود [۶]. از این رو نیاز به یافتن یک پروتواسکولکس کش جدید و مناسب با ویژ گی های زیر ضروری به نظر می رسد: سمی نباشد و عوارض جانبی وسیستمیک آن حداقل باشد، با دوز کم و در مدت کوتاه باعث از بین رفتن پروتواسکولکس ها گردد، در مایع هیداتید پایدار باشد، هم چنین تهیه آن راحت و در دسترس و ارزان باشد [۱۷].

امروزه ترکیبات ضد میکروبی گیاهان دارویی ارزیابی شده و به عنوان جایگزین مواد شیمیایی در از بین بردن میکروارگانیسم ها مطرح هستند. محققین از عصاره های مختلف آبی، آبی _ الکلی، الکلی، کلروفرمی و گاهی اسانس گیاهان بدین منظوراستفاده نموده اند که بر اساس نوع گیاه و هدف تحقیق حلال مناسب انتخاب می گردد. مؤذنی و همکاران در سال ۲۰۱۱، مرگ و میر پروتواسکولکس ها راباعصاره ۱۰۰ mg/ml زنجبیل بعد از ۳۰ دقیقه، ۱۰۰٪ گزارش کردند [۱۸]. سجادی و همکاران بیشترین اثر پروتواسکولکس کشی عصاره کلروفرمیک سیر با غلظت ۲۰۰ mg/ml و پس از ۳۰ دقیقه، ۹۷/۷٪ گزارش نمودند [۱۹]. هم چنین غلامی و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش نمودند که عصاره ۱۰۰ mg/ml گل آقطعی بعد از ۶۰ دقیقه، باعث مرگ و میر ۹۶/۶٪ پروتواسکولکس ها شده است [۲۰]. لاک من[1] و همکاران در سال۲۰۱۳، در مطالعه ای اثر عصاره آبی گزنه (Urtica dioca) و کاسنی (Tanacetum vulgare) را در غلظت ۴ میلی گرم بر میلی لیتر بعد از ۳۰ دقیقه بترتیب ۹۷/۸ ٪ و ۹۶/۲٪ گزارش نمودند [۲۱]. در این تحقیق، عصاره آبی انار ترش بر روی بقای پروتواسکولکس کیست هیداتید مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین اثر پروتواسکولکس کشی انار ترش مربوط به غلظت ۷۰ و۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر بوده که بعد از ۱۵دقیقه ۱۰۰٪ پروتواسکولکس ها از بین رفته اند. در مجموع رقت ۸۰ میلی گرم در همه زمان ها فعالیت پروتواسکولکس کشی بیشتری نسبت به سایر رقت ها از خود نشان داده است.

اثرات ضد باکتریای، ضد قارچی و ضد انگلی این گیاه توسط تعدادی از محققین به اثبات رسیده است. بررسی انجام شده توسط دهام[2] و همکاران در سال ۲۰۱۰ در هند، نشانگر تاثیر عصارهء انار بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و آسپرژیلوس نایجر است [۲۲]. همچنین فهمی[3] و همکاران در سال ۲۰۰۹ گزارش نمودند که عصاره پوست و برگ انار در آزمایشگاه بعد از ۲۴ ساعت باعث از بین رفتن ۱۰۰٪ کر م بالغ شیستوزومامانسونی و فرم لاروی شیستوزومولا می شود [۲۳]. در بررسی دیگر بونویبولوال[4] و همکاران در سال ۲۰۱۳ در تایلند، خاصیت ضد کرمی عصاره الکلی پوست انار را بر روی کاهش تخم نماتودها در دستگاه گوارش بره ها گزارش نمودند [۲۴]. در بررسی زیبایی و همکاران عصاره متانولی ۰/۱٪ ریشه انار بعد از نیم ساعت و بعد از ۶ ساعت بترتیب باعث از بین رفتن ۲۹/۲٪ و ۸۲/۲٪ پروتواسکولکس های کیست هیداتید در آزمایشگاه شده است [۲۵].

1-Bunvibolval
2- Dahham
3-Fahmy
4-Bunvibolval

اثرات فارماکولوژی انار از دیرباز بیان شده و در مدارک یونان و مصر به آن اشاره شده است. محققین اثبات کرده اند که تانن موجود در انار اثرات ضدکرمی، ضد باکتریایی، آنتی اکسیدان و پاسخ بهتر سیستم ایمنی و ارزش تغذیه ای در انسان و دام را دارد. تانن حاوی ترکیبات فنلی زیادی است که این ترکیبات درتعدادی از گیاهان منجمله انار یافت می شود. محققین معتقد هستند که استفاده از ترکیبات فنلی در زنجیره غذایی علفخواران می تواند در کنترل بیماری های کرمی مؤثر واقع شود و به طور غیر مستقیم روشی ارزان و آسان برای بهبود سلامت جامعه می باشد [۲۶]. بررسی محققین نشانگر این مسئله است که تنوع زیادی در بین انارهای هر منطقه از نظر ژنتیکی وجود دارد. پارامترهای متعددی وجود دارد که باعث تمایز انارهای شیرین و ترش می شود. اسیدسیتریک عامل اصلی ترشی انار است و کم بودن این اسید در انار باعث شیرینی انار می گردد. برخی از محققین نسبت کل قندها به میزان اسیدسیتریک Soure index(S.I) را بعنوان مقیاس قابل اعتمادی جهت طبقه بندی مزه میوه انار پیشنهاد می نمایند [۲۷].

در این مطالعه میزان اسیدسیتریک و برخی از ترکیبات عصاره های انار های تهیه شده از بهشهر به روش کروماتوگرافی تعیین شد. میزان اسید سیتریک انار ترش ۰/۸ میلی گرم بر میلی لیتر و اسید سیتریک انار شیرین ۰/۰۲ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین شده است که میزان اسید سیتریک انار ترش تقریباً ۴۰ برابر انار شیرین است. با در نظر گرفتن این معیار به راحتی انار ترش از انار شیرین متمایز می گردد.

بررسی خاصیت پروتواسکولکس کشی عصاره آبی انار با اطلاعات ما، تاکنون انجام نگرفته است و این اولین بررسی در این زمینه می باشد.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان می دهدکه عصاره آبی انار ترش خاصیت پروتواسکولکس کشی دارد. با وجود آن که نتایج در زیرگروه های مربوط به غلظت ها ظاهراً نزدیک بهم هستند ولی آزمون تحلیل واریانس دو طرفه (Two Way ANOVA)، زیرگروه های مختلفی را رقم زده است مثلا باتوجه به جدول ۲، غلظت ۸۰ mg/ml عصاره انار ترش باکنترل مثبت (نمک اشباع) در یک زیر گروه قرارگرفته است و این گروه (گروه ۴) با سایر گروه ها (۱ و ۲ و ۳) اختلاف معنی داری در فعالیت پروتواسکولکس کشی نشان داده است.

جهت استفاده از عصاره آبی انار ترش به عنوان پروتواسکولکس کش در جراحی، مطالعات تکمیلی برای بررسی عوارض جانبی در حیوانات آزمایشگاهی ضروری به نظر می رسد.

تشکر و قدر دانی

از مسئولین کشتارگاه سلیمانی واقع در جنوب تهران تشکر و قدر دانی می گردد. این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (کد ۵۸۳) انجام پذیرفت.

References

1. Arfah F, Danesh Pajou Publishers, Danesh Pajou Publishers, 1993;Text in Persian:P.147-64
2. John DT, Petri WA, Markell EK, Voge M. Markell and Voge's medical parasitology: Elsevier Health Sciences; 2006.
3. Eckert J, WHO-OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern, 2001.
4. Fen-Jie L, Prevalence of Echinococcus granulosus in dogs in Xinjiang Uygur Autonomous Region, PRC, Anderson FL, ed. Compendium on Cystic Echinococcosis with Special Reference to the Xinjiang Uygur Autonomous Region, The People's Republic of China, 1993:168-76.
5. PRASAD J, Bellamy P, Stubbs R, IOTA NSTILLATION OF SCOLICIDAL AGENTS INTO HEPATIC HYDATID CYSTS: CAN IT ANY LONGER BE JUSTIFIED? New Zealand medical journal, 1991;104(917):336-7.
6. Sahin M, Eryilmaz R, Bulbuloglu E, The effect of scolicidal agents on liver and biliary tree (experimental study), Journal of Investigative Surgery, 2004;17(6):323-6.
7. Poyrazoğlu E, Gökmen V, Artık N, Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (Punica granatum L.) grown in Turkey, Journal of food composition and analysis, 2002;15(5):567-75.
8. Moazeni M, Nazer A, In vitro effectiveness of garlic (Allium sativum) extract on scolices of hydatid cyst. World journal of surgery, 2010;34(11):2677-81.
9. Rouhani S, Salehi N, Kamalinejad M, Zayeri F. Efficacy of Berberis vulgaris aqueous extract on viability of Echinococcus granulosus protoscolices, Journal of Investigative Surgery, 2013;26(6):347-51[Persian]
10. S R, N S, M K, F Z, A M, Scolicidal effects of Berberis vulgaris fruit extract on hydatid cyst protoscolices, Tehran University Medical Journal, May 2014;Vol.72,No.2:121-128. [Persian]
11. Abdul F, Jabbar-Mustafa, The effect of aqueous and alcoholic extract of cyperus longous (cyperaceae) and tow drugs (tinidazole and praziquantel) on killing the protoscolices of echinococcus granulosus in vitro, BasJVetResVol8,No2. 2009.
12. Akpinar-Bayizit A, Yilmaz-Ersan L, Ozcan T, The therapeutic potential of pomegranate and its products for prevention of cancer: INTECH Open Access Publisher; 2012.
13. Arun N, Singh D. Punica granatum: a review on pharmacological and therapeutic properties, International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2012;3(5):1240.
14. Smego RA, Sebanego P, Treatment options for hepatic cystic echinococcosis, International journal of infectious diseases, 2005;9(2):69-76.
15. Ustünsöz B, Akhan O, Kamiloğlu M, Somuncu I, Uğurel M, Cetiner S, Percutaneous treatment of hydatid cysts of the liver: long-term results, AJR American journal of roentgenology, 1999;172(1):91-6.
16. Altindis M, Arikan Y, Cetinkaya Z, Polat C, Yılmaz S, Akbulut G,“ et al”, Octenidine hydrochloride in hydatid disease, Journal of Investigative Surgery, 2004;17(1):41-4.
17. Pawłowski Z, Eckert J, Vuitton D, Ammann R, Kern P, Craig P,“ et al”, Echinococcosis in humans: clinical aspects, diagnosis and treatment, WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern, 2001:20-66.
18. Moazeni M, Nazer A, In vitro lethal effect of Zingiber officinale R, on protoscolices of hydatid cyst from sheep liver, Microbiology Research. 2011;2(2):25.
19. Sadjjadi SM, Zoharizadeh MR, Panjeshahin MR, In vitro screening of different Allium sativum extracts on hydatid cysts protoscoleces, Journal of Investigative Surgery, 2008;21(6):318-22[Persian]
20. Gholami S, Rahimi-Esboei B, Ebrahimzadeh M, Pourhajibagher M, In vitro effect of Sambucus ebulus on scolices of Hydatid cysts, European review for medical and pharmacological sciences, 2013;17(13):1760-5[Persian]
21. Al-Barwary LT, The Anthelmintic Effect Of Urtica dioica And Tanacetum vulgare L, On Protoscoleces Of Echinococcus granulosus.
22. Dahham SS, Ali MN, Tabassum H, Khan M, Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (Punica granatum L.), Am Eurasian J Agric Environ Sci. 2010;9(3):273-81.

23. Fahmy ZH, El-Shennawy AM, El-Komy W, Ali E, Hamid SSA, Potential antiparasitic activity of pomegranate extracts against schistosomules and mature worms of Schistosoma mansoni: in vitro and in vivo study, Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 2009;3(4):4634-43.
24. Bunviboolvat P, Taechaarpornkul N, Saratham J, Sungpradit S, Jirapattharasate C, Nakthong C, "et al", Anthelmintic effects of ethanolic extracts from pomegranate peels, mangosteen peels and tamarind seeds on gastrointestinal nematode egg counts in lambs, Journal of Applied Animal Science Vol. 2013;6(2).
25. M Z, B J, Efficaay Root of Pomogranate Extract on Viability of Echinococcus Granulosus Protoscolices in vitro, Medical University Alborz Publication, 2014;3:205-210.
26. Parseh H, Hassanpour S, Emam-Djome Z, Lavasani AS, Mahmoodabady HZ, CHabok M, "et al", editors, Antimicrobial properties of Pomegranate (Punica granatum L.) as a tannin rich fruit: a review. The 1th International and The 4th National Congress on Recycling of Organic Waste in Agriculture Iran; 2012.
27. Hasnaoui N, Mars M, Ghaffari S, Trifi M, Melgarejo P, Hernandez F, Seed and juice characterization of pomegranate fruits grown in Tunisia: Comparison between sour and sweet cultivars revealed interesting properties for prospective industrial applications, Industrial Crops and Products, 2011;33(2):374-81

Original Article

Invitro effectiveness of Punica granatum Aqueous Extract on Viability of Echinococcus granulosus Protoscolex

*Jafari Z[1], Rouhani S[2] *, Niyyati M [3], Kamalinejad M[4], Zayeri F[5]*

[1]Msc Student of Medical Parasitology, Dept. of Parasitology& Mycology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2]Professor of Medical Parasitology, Dept. of Parasitology& Mycology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Associate Professor of Medical Parasitology, Dept. of Parasitology& Mycology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4]Instructor of Pharmacology Dept., Faculty of Pharmaceutical, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran,
[5]Associate Professor of Proteomics Research Center & Bio statistic Dep., Paramedical faculty, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran,
***Corresponding author**: Koodak-yar Ave., Daneshjoo Blvd, Yaman St., Chamran Highway,Tehran.
Email: srouhani11@yahoo.com

Journal of North Khorasan University of Medical sciences 2017;9(1): 65-74

Abstract

Background and Objectives: *Hydatid cyst is observed in any organ, especially in liver and lung. Use of effective scolicidal agents during hydatid cyst surgery is essential to prevent the secondary infection. Most of these agents are not safe and effective. Many studies have shown that Punica granatum has antibacterial, antifungal and antiparasitical effects. This study was undertaken for the first time to evaluate the scolicidal effect of P. granatum aqueous extract in vitro.*

Material & Methods: *Viability of protoscoleces of hydatid cyst was confirmed by 0.1% eosin staining. Normal saline and hypertonic saline were used as negative and positive controls, respectively. Protoscoleces were treated with 60, 70 and 80 mg/ml of the sour P. granatum extract (based on the total amount of citric acid). All extracts were examined for 5, 10, and 15 minutes. Two-way ANOVA and Tukey's test were used for data analysis.*

Results: *Sour P. granatum extract at the concentration of 80 mg/ml killed 100% of protoscoleces after 15 minutes of application. Scolicidal effect of Sour P. granatum extract at the concentration of 70 mg/ml was lower than that in 80 mg/ml. However, after 15 minutes of application, all of protoscoleces were killed. We observed a statistically significant difference in the protoscolicidal activity of the sour aqueous extract with different dilutions (60, 70, 80 mg/ml) ($p > 0.05$).*

Conclusion: *Our results suggest that aqueous extract of P. granatum can be a promising source of potential protoscolicidal agent. Regarding the usage of pomegranate and aqueous extract as drink and food, it seems this component is harmless and safe. Therefore, after being examined in vivo and additional experiments, it may be used as a suitable and effective scolicidal in surgery.*

Key word: *Hydatid cyst, Pomegranate (Punica granatum), Protoscolex, Aqueous extract*

Received:22 Oct 2016
Revised: 26 Nov 2016
Accepted: 27 Nov 2016